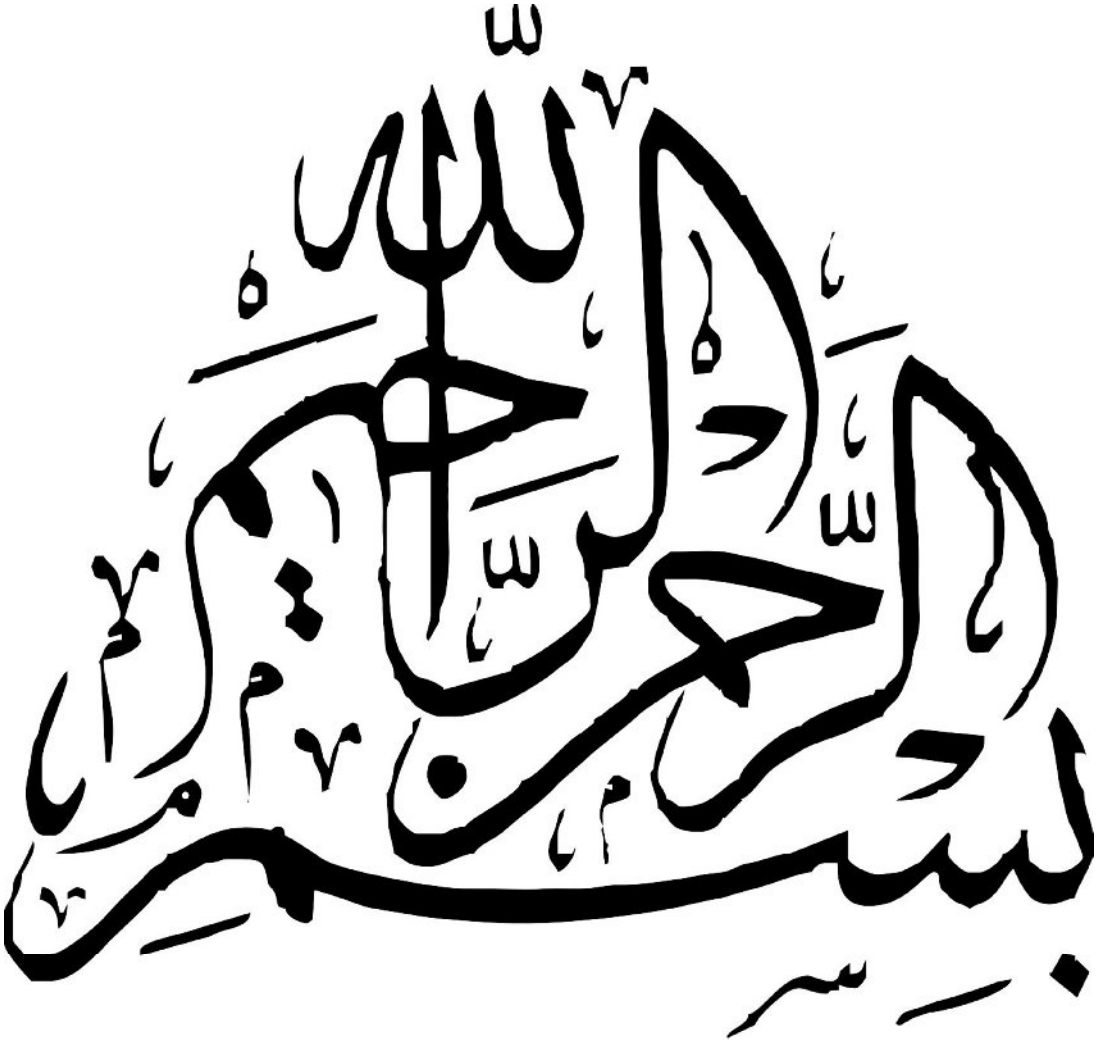

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده منابع طبیعی

بهینه سازی شوک حرارتی جهت القاءتتراپلوییدی در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان *Oncorhynchusmykiss*

پایان نامه کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان

امیر وفائی سعدی

استاد راهنما

دکتر سالار درافشان

۱۳۹۰

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده منابع طبیعی

پایان نامه کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان آقای امیر وفائی سعدی

تحت عنوان

بهینه سازی شوک حرارتی جهت القاءتتراپلوییدی در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*

در تاریخ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر سالار درافشان

۲- استاد مشاور پایان نامه دکتر علی نکویی فر

۳- استاد داور پایان نامه دکتر منصوره ملکیان

۴- استاد داور پایان نامه دکتر یزدان کیوانی

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده منابع طبیعی دکتر نورا... میر غفاری

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع

این پایان‌نامه (رساله) متعلق به دانشگاه صنعتی

اصفهان است

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشت
فهرست جداول ..... ده
فهرست اشکال ..... یازده
چکیده ۱

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه و اهداف تحقیق ۲

فصل دوم: کلیات و مرور منابع

۲-۱ کلیات ۶
۲-۱-۱ تتراپلوییدی ۶
۲-۲ مرور منابع ۱۱
۲-۲-۱ القاء تتراپلوییدی در ماهیان ۱۲
۲-۲-۲ روش‌های شناسایی ماهیان دستکاری شده کروموزومی ۱۴
۲-۲-۳ رابطه اندازه تخم و بقاء ۱۵

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱ مواد مصرفی ۱۸
۳-۲ مواد غیرمصرفی ۱۸
۳-۳ محل انجام تحقیق ۱۸
۳-۴ طرح کلی تحقیق ۱۹
۳-۴-۱ روش اجرای بخش اصلی تحقیق ۱۹
۳-۴-۲ روش تعیین شوک بهینه حرارتی ۱۹
۳-۴-۳ روش‌های مورد استفاده در سنجش صحت پلوییدی ۲۲
الف ـ سنجش ابعاد هسته و گلبول قرمز ۲۲
ب ـ روش آنالیز NORs ۲۳
۳-۵ تجزیه و تحلیل آماری ۲۳

فصل چهارم: نتایج

۴-۱ اثرات دما، زمان و دوره‌ی شوک دهی در القاءتتراپلوییدی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان ۲۵
۴-۱-۱ اثر دمای شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف ۲۵
۴-۱-۲اثر دوره‌ی شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف ۲۷

۴-۱-۳ اثر زمان آغاز شوک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف ۲۸
۴-۱-۴ اثر قطر تخمک بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در بین تیمارهای مختلف ۲۹
۴-۲ نتایج تعیین شوک بهینه حرارتی جهت القای تتراپلوییدی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان ۳۱
۴-۲-۱ میران بقاء در مرحله چشم زدگی در تیمارهای مختلف ۳۱
۴-۲-۲ میزان بقاء از چشم زدگی تا مرحله تفریخ تیمارهای مختلف ۳۴
۴-۲-۳ میزان بقاء از تفریخ تا مرحله شنای فعال تیمارهای مختلف ۳۸
۴-۲-۴ درصد القاء تتراپلوییدی در تیمارهای مختلف ۴۱
۴-۲-۵ بازده القاء تتراپلوییدی در تیمارهای مختلف ۴۴
۴-۳ نتایج سنجش پلوییدی ۴۶
۴-۳-۱ گسترش خونی ۴۶
۴-۳-۲ آنالیز NORs ۴۸

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

۵-۱میزان بازماندگی ۴۹
۵-۱-۱میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار تا مرحله چشم زدگی ۴۹
۵-۱-۲ میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار از مرحله چشم زدگی تا مرحله تفریخ ۵۱
۵-۱-۳ میزان بازماندگی گروه‌های مختلف تیمار از مرحله تفریخ تا شنای فعال ۵۱
۵-۲سنجش هسته گلبول‌های قرمز در انواع دیپلویید و تتراپلویید ۵۲
۵-۳ درصد القاء تتراپلوییدی در بین تیمارهای مختلف ۵۳
۵-۲ نتیجه‌گیری ۵۷
۵-۳ پیشنهادها ۵۸
منابع ۵۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱ برخی شوک‌های فیزیکی بهینه شده جهت القای تتراپلوییدی درقزل‌آلای رنگین‌کمان ۱۱
جدول ۲-۲ برخی گزارش‌ها درخصوص القاء تتراپلوییدی درگونه‌های مهم تجاری ۱۵
جدول ۴-۱ اثردمای شوک برشاخص‌های اندازه‌گیری شده صرف نظراززمان آغاز شوک،دوره شوک وقطرتخمک قزل‌آلای-رنگین کمان ۲۷
جدول ۴-۲ اثردوره‌ی شوک برشاخص‌های اندازه‌گیری شده صرف نظراززمان،دمای شوک وقطرتخمک قزل‌آلای‌رنگین-کمان ۲۸
جدول ۴-۳ اثرزمان آغازشوک برشاخص‌های اندازه‌گیری شده صرف نظرازدما،دوره‌ی شوک وقطرتخمک قزل‌آلای‌رنگین-کمان ۲۹
جدول ۴-۴ اثرقطرتخمک برشاخص‌های اندازه‌گیری شده صرف نظرازدما،زمان آغاز و دوره‌ی شوک در قزل‌آلای‌رنگین-کمان ۳۰
جدول ۴-۵ خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر دما،دوره،زمان شوک دهی وقطرتخمک بر بقاء تا مرحله چشم زدگی..... ۳۱
جدول ۴-۶ خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثردما، دوره، زمان شوک دهی وقطرتخمک بر بقاء تامرحله تفریخ ۳۵
جدول ۴-۷ خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر دما، دوره، زمان شوک دهی و قطرتخمک بر بقاء از تفریخ تا شنای فعال..... ۳۸
جدول ۴-۸ خلاصهنتایجتجزیهواریانساثردما،دوره،زمانشوکدهیوقطرتخمک بردرصد تتراپلوییدی..... ۴۲
جدول ۴-۹ خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر دما، دوره، زمان شوک دهی و قطرتخمک بر بازده تتراپلوییدی ۴۴
جدول ۴-۱۰ ابعاد گلبول‌های قرمز در ماهیان قزل‌آلای‌رنگین‌کمان دیپلویید و تتراپلویید..... ۴۷
جدول ۴-۱۱ میزان فراوانی NORs در سلول‌های تتراپلویید و دیپلویید ۴۸

فهرست اشکال

شکل ۲-۱ نمای شماتیک روش‌های مستقیم و غیرمستقیم القای تریپلوییدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان ۷
شکل ۲-۲ نمای شماتیک القاء تتراپلوییدی، ماده زاد میتوزی و نرزاد به وسیله جلوگیری از اولین تقسیم میتوزی ۸
شکل ۳-۱ بخشی از الگوی کلی اجرای القای شوک حرارتی در ماهی قزل‌آلای‌رنگین کمان..... ۲۰
شکل ۳-۲شوک دهی با استفاده ازحمام آب گرم جهت القاء پیلوییدی در تخم‌های لقاح یافته قزل‌آلای‌رنگین کمان ۲۱
شکل ۴-۱ میزان بقاء دربین تیمارهای مختلف در دمای C° ۲۸ در دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر تا مرحله چشم زدگی..... ۳۲
شکل ۴-۲ میزان بقاء دربین تیمارهای مختلف در دمای C° ۳۰ در دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر تا مرحله چشم زدگی..... ۳۳
شکل ۴-۳ میزان بقاء در بین تیمارهای مختلف در دمای C° ۳۲ در دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر تا مرحله چشم زدگی..... ۳۴
شکل ۴-۴ میزان بقاء در بین تیمارهای مختلف در دمای C° ۲۸ در دو گروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر مرحله چشم زدگی تا تفریخ ۳۶
شکل ۴-۵ میزان بقاء در بین تیمارهای مختلف در دمای C° ۳۰ در دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر مرحله چشم زدگی تا تفریخ ۳۷
شکل ۴-۶ میزان بقاء دربین تیمارهای مختلف در دمای C° ۳۲ در دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر مرحله چشم زدگی تا تفریخ ۳۷
شکل ۴-۷ میزان بقاء در بین تیمارهای مختلف در دمای C° ۲۸ در دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی متر از مرحله تفریخ تا شنای فعال ۳۹
شکل ۴-۸ میزان بقاء در بین تیمارهای مختلف در دمای C° ۳۰ در دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر از مرحله تفریخ تا شنای فعال ۴۰
شکل ۴-۹ میزان بقاء دربین تیمارهای مختلف در دمای C° ۳۲ در دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر از مرحله تفریخ تا شنای فعال ۴۰
شکل ۴-۱۰ میزان درصد تتراپلوییدی دربین تیمارهای مختلف دما، زمان و دوره شوک در هر دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر ۴۳
شکل ۴-۱۱ میزان بازده تتراپلوییدی دربین تیمارهای مختلف دما، زمان و دوره شوک در هر دوگروه تخمکی بالای ۵ و زیر ۵ میلی‌متر ۴۵
شکل ۴-۱۲ گلبول‌های قرمز در ماهیان دیپلویید و تتراپلویید قزل‌آلای‌رنگین کمان..... ۴۶
شکل ۴-۱۳تعداد هستک‌ها در سلول دیپلویید (۲n) و سلول تتراپلویید (۴n) ماهی قزل‌آلای‌رنگین کمان..... ۴۸

چکیده

تتراپلوییدی روشی مهم برای تولید ماهیان تریپلوییدبه طریق غیرالقایی است که برای تولید دیگر سطوح پلوییدی (پنتا، هگزا، هپتا و اکتا پلوییدی) در آبزیان اهمیت دارد. استفاده عملی از تتراپلوییدهای قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، برای تولید ماهیان تریپلوییدبستگی به مؤثر بودن فرایند القاء شوک و توانایی تتراپلوییدها در تولیدمثل و ایجاد نسل قابل زیست دارد. لذا اولین و مهمترین عامل جهت دستیابی به ماهیان تتراپلوییدبه در گله‌های مختلف، بهینه سازی شوک جهت القای پلوییدی است. در این تحقیق موثرترین شوک حرارتی از میان درجه حرارت‌های ۲۸، ۳۰ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد، دوره ی شوک ۱، ۵ و ۱۰ دقیقه و همچنین زمان آغاز شوک ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۸۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح در دمای آب ۱۱ درجه سانتی‌گراد برای القاء تتراپلوییدی دو سایز تخمکی متفاوت بالای ۵ میلی‌متر و زیر ۵ میلی‌متر مورد بررسی قرار گرفت. دو گروه شاهد شامل شاهد معمولی و شاهد فیزیکی برای هر اندازه تخمکی در نظر گرفته شد و هر یک از واحدهای آزمایشی در ۳ تکرار انجام شده و نهایتا ۲۷۶ واحد آزمایشی برای به دست آمدن تیمار بهینه القاء تتراپلوییدی در تخم‌های قزل-آلای رنگین‌کمان مورد استفاده قرار گرفت. نرخ بقاء تا مراحل چشم‌زدگی، تفریخ و شنای فعال در بین دو گروه تخمکی و در بین تیمارهی مختلف هر گروه مورد مقایسه قرار گرفتند. شناسایی ماهیان تتراپلوییدبر اساس اندازه-گیری ابعاد سلولی گلبول‌های قرمز و همچنین آنالیز NORs در ماهیانی که در مرحله شنای فعال بودند، انجام شد. نتاج نشان داد که اختلاف معنی داری در میزان بقاء مرحله لقاح تا چشم‌زدگی در بین دو گروه تخمکی و همچنین بین تیمارهای مختلف در هر گروه وجود دارد ($p<0.05$)، اما در میزان بقاء مرحله چشم‌زدگی تا تفریخ در بین دو گروه تخمکی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0.05$). بر اساس اندازه‌گیری‌های ابعاد گلبول قرمز و همچنین آنالیزNORs درصد القا ء تتراپلوییدی در دو گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر و زیر ۵ میلی‌متر به ترتیب ۰ تا ۶۷٪ و ۰ تا ۷۵٪ برآورد شد. بالاترین میزان درصد تتراپلوییدی در گروه تخمکی بالای ۵ میلی‌متر در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد ، ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح به مدت ۱۰ دقیقه (۶۷٪) و ۵ دقیقه (۶۰٪) به دست آمد. در حالی که در گروه تخمکی زیر ۵ میلی‌متر بالاترین درصد تتراپلوییدی(۷۵٪) در دمای ۲۸ درجه سانتی-گراد، ۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح و به مدت ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. مقایسه میزان بازده تتراپلوییدی بین گروه‌های مختلف نشان داد که شوک حرارتی ۲۸ درجه سانتی‌گراد و زمان آغاز شوک ۶۵ ساعت ـ درجه و همچنین دوره شوک ۱۰ دقیقه موثرترین شوک برای تولید تتراپلوییدها در گروه تخمکی بالای ۵ میلی متر به شمار می‌آید که می تواند بازده تتزاپلوییدی را تا ۱۲ درصد افزایش دهد ($p<0.05$). در حالی که تیمارهای مختلفی در گروه تخمکی زیر ۵ میلی متر شامل ۲۸ درجه سانتی‌گراد ، ۷۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح دوره شوک ۵ دقیقه (۷٪)، ۳۲ درجه سانتی‌گراد ،۶۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح و دوره شوک ۱ دقیقه (۶/۳٪) و همچنین ۳۲ درجه سانتی‌گراد؛ ۴۵ ساعت ـ درجه پس از لقاح و دوره شوک ۱ دقیقه (۶/۲٪) برای بالاترین بازده تتراپلوییدی مناسب هستند ($p<0.05$). به طور کلی القاء تتراپلوییدی در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان کاملا به زمان آغاز شوک و دوره شوک حرارتی بستگی دارد. افزایش دمای شوک می‌تواند روی نرخ بقاء اثر منفی داشته باشد در حالی که تغییر در زمان آغاز شوک بستگی به حساسیت تخم‌ها به طور مثال قطر تخمک می‌تواند منجر به افزایش یا کاهش بقاء را در جنین‌ها شود. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که شوک های حرارتی مختلف برای القای بهینه‌ی تتراپلوییدی در گروه‌های تخمکی متفاوت از نظر اندازه در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: تتراپلوییدی، قزل‌آلای‌رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*، شوک بهینه حرارتی، اندازه تخمک.

فصل اول
مقدمه

قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از مهمترین ماهیان سردآبی است که به منظور توسعه فعالیت های شیلاتی و آبزی پروری به بسیاری از مناطق جهان معرفی شده است. اگرچه محدوده اصلی زیستگاه آن آمریکای شمالی از آلاسکا تا کالیفرنیا است اما دو واریته اصلی از آن به نامهای قزل آلای مهاجر یا پولادسر[1] و قزل آلای ساکن در آب شیرین[2] در آبهای مناطق وسیعی از جهان پراکنده هستند.

قزل‌آلای رنگین کمان بیشترین سهم تولید آزادماهیان پرورشی را پس از آزاد ماهی اطلس *Salmo salar* به خود اختصاص می دهد و به طور قابل ملاحظه ای از سطح تولید بالاتری نسبت به سایر گونه های آزادماهیان از جمله قزل آلای دریایی برخوردار است. هم اکنون بخشی از تولید تجاری این گونه در سطح جهانی متعلق به تولید ماهیان دستکاری شده کروموزومی، شامل انواع تریپلوییدی، تریپلوییدی تمام ماده و آمیخته های بین گونه ای آن با سایر آزادماهیان است [۱].

در سالهای اخیر، فعالیت های چشمگیری در زمینه توسعه آبزی پروری خصوصاً تولید گونه سردآبی قزل آلای رنگین کمان اجرا شده است. همچنین کاربرد روش‌های مدرن و نوین در پرورش آبزیان به تدریج با درک بهتر اصول و قوانین ژنتیکی توسعه یافته است. ویژگی‌های خاص آبزیان نظیر قابلیت تحمل سطوح مختلف

---

۱ - Steel head

۲- Kamloops

پلوییدی، لقاح خارجی، دوره رشد نسبتاً کوتاه و حجم بالای گامت‌های استحصالی در هر دوره تکثیر منجر به توسعه بیشتر ژنتیک در آبزیان شده است. پدیده بلوغ جنسی یکی از مهم ترین مشکلات پرورش دهندگان آبزیان خصوصاً ماهیان سردآبی است. بلوغ جنسی در آزادماهیان منجر به کاهش رشد [۶۰]، کاهش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، کاهش کیفیت لاشه و رنگدانه‌های موجود در بافتها می شود. علاوه بر این، تفاوت رشد وابسته به جنسیت در بسیاری از ماهیان (نظیر آزادماهیان) به اثبات رسیده است [۳۲]، لذا تولید و پرورش ماهیان عقیم یا تمام ماده به دلیل حذف کامل بلوغ و یا تاخیر در بروز آن در آبزیان پرورشی ارجحیت دارد [۲۸].

مطالعه ژنتیک ماهی در اوایل قرن بیستم، پس از شناخت و درک صفات کمی و اصول ژنتیک آغاز گردید، اما به دلیل فقدان شناخت کافی از ژنتیک آبزیان خصوصاً ماهی و عدم علاقه دست اندر کاران به مطالعات ژنتیکی در آبزی پروری، همچنین محدودیت و جوان بودن صنایع شیلاتی و آبزی پروری در آن زمان، عملاً مطالعات چشمگیری در این زمینه تا دهه ۱۹۶۰ انجام نگرفت و در حقیقت تلاشهای اصلی در زمینه ژنتیک ماهی در مقیاس تجاری در زمینه بهگزینی انواع ماهیان تجاری نظیر قزل آلای رنگین کمان به منظور بهبود ضریب تبدیل غذایی و رشد به اجرا درآمد [۱]. به تدریج با درک اصول و قوانین ژنتیک و نیز توسعه آبزی پروری به عنوان یکی از صنایع مهم زیر بخش کشاورزی، کاربرد روش های مدرن و نوین در آبزیان توسعه یافت. در این خصوص زیست فنآوری های جدید نظیر دستکاری کروموزومی و القاءی پلوییدی به عنوان یکی از عوامل موثر در زمینه تولید آبزیان پرورشی در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ به طور کامل مورد پذیرش و کاربرد قرار گرفت به طور کلی می توان گفت که از اوایل دهه ۱۹۸۰، تحقیقات ژنتیکی در زمینه شیلات و آبزیان توسعه مداوم خود را آغاز نمود و امروزه این تحقیقات به صورت گسترده و چشمگیر در جنبه های مختلف آبزی پروری در حال آزمایش و تجاری‌سازی است. انواع مختلفی از این فناوری ها مانند بهگزینی، آمیخته گری، تغییر جنسیت، اصلاح نژاد و القاء پلوییدی در حال حاضر در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار می گیرند[۱].

پلی پلوییدی دارا بودن بیش از دو سری کروموزوم در هر سلول است که به طور طبیعی در برخی از گیاهان رخ می دهد و منجر به پدیده ژیگانتیسم[۱] می شود. ژیگانتیسم از افزایش اندازه سلول که خود از افزایش محتوای دی. اِن. اِ.[۲] در سلول پلی پلوییدی است، ناشی می‌شود. این پدیده (پلی پلوییدی) در جانوران از طریق القاء کردن به وجود می آید. در پستانداران این پدیده نادر است اما در برخی پرندگان، خزندگان، دوزیستان و ماهی‌ها رخ می دهد. بر خلاف گیاهان، پلی پلوییدی در جانوران منجر به ژیگانتیسم نمی شود. اگر چه افزایش اندازه سلول و هسته در آنها رخ می دهد اما این افزایش با کاهش تعداد سلول ها در جانوران همراه است. وقوع پلی پلوییدی می تواند در اثر اختلالات وقایع سلولی در بین لقاح و اولین تقسیم میتوزی جنین رخ بدهد.

در ماهی‌ها رسیدگی تخمک ها قبل از لقاح و درخلال میوز I رخ می‌دهد و تخمک نابالغ در میوز II باقی می ماند که در این حالت تخمک‌ها دارای دو سری کروموزوم هستند. به محض فعال سازی تخمک (معمولاً به وسیله لقاح، تغییر در فشار اسمزی یا تماس با اسپرم گونه دیگر)، میوز II از سر گرفته می شود و جداشدن دو

۱- Gigantism : بزرگ شدن سلول‌های بدن

۲- DNA

کروموزوم خواهری اتفاق می افتد. یک دسته از این کروموزوم‌ها مربوط به گویچه قطبی، در حالی که دسته دیگر مربوط به تخمک است. هسته سلول تخمک با هسته سلول اسپرم امتزاج می یابند و یک سلول تخم دیپلوییید به وجود می آید. اگر ادامه فعالیت میوز Π مختل شود (به صورت طبیعی یا به وسیله القاء شوک)، جدایی کروموزوم ها صورت نمی گیرد و دو دسته کروموزوم در سلول تخم باقی می‌ماند. در این حالت اگر لقاح اتفاق بیفتد یک دسته کروموزومی مربوط به اسپرم به تخمک منتقل شده و باعث به وجود آمدن تخم تریپلوییید می شود. اگر فعال سازی تخمک بدون لقاح اتفاق افتد یا لقاح به وسیله اسپرمی که قبلاً اشعه دیده و محتوای دی.اِن.اِ. آن غیر فعال شده اتفاق بیافتد و در ادامه روند تقسیم از فعالیت میوز Π جلوگیری شود، یک تخم دیپلوییید به وجود می آید که هر دو سری کروموزوم آن مربوط به والد مادری است که به این نوع تخم، ماده زاد میوزی گفته می‌شود.

اختلال در اولین تقسیم میتوزی (خواه به صورت طبیعی یا به صورت القاء شوک) می تواند منجر به نوع دیگری از تخم‌ها به نام‌های ماده زاد میتوزی و نرزاد که دارای دو سری کروموزوم در هر سلول به ترتیب با منشاء مادری و پدری هستند و تتراپلوییدی که دارای چهار سری کروموزوم در هر سلول است شوند.

تتراپلوییدی (دارا بودن چهار سری کروموزوم در هر سلول) نوع دیگری از پلوییدی در ماهیان است که روش تولید آن همانند تریپلوییدی با استفاده از شوک های فیزیکی یا شیمیایی است. با این تفاوت که شوک دیر هنگام و بعد از جدایی دومین گویچه قطبی و قبل از اولین تقسیم میتوزی سلول تخم است.

تتراپلوییدی می‌تواند به عنوان یک منبع مهم در تولید ماهیان تریپلوییید کاملاً عقیم محسوب شود. همچنین از گله تتراپلوییید می‌توان از یک منبع بالقوه برای استفاده در سطوح دیگر پلوییدی مثل پنتا، هگزا، هپتاپلوییدی نام برد.

امکان القای پلوییدی با استفاده از انواع شوک های شیمیایی [۵۸]، الکتریکی [۶۸] و فشار هیدرواستاتیک [۴۷] وجود دارد. اما استفاده از شوک های دمایی خصوصاً شوک گرمایی برای آزادماهیان بنا به دلایلی نظیر سهولت کاربرد و قابلیت اعمال بر حجم بالایی از تخم ها، مرسوم ترین روش محسوب می شود [۳، ۵۸]. موفقیت القاءی پلوییدی، تابع شرایط محیطی و ویژگی های والدین است و به دلیل اختلاف حساسیت در تخم های بین نژاد و گونه های نزدیک، شوک های مختلفی برای نتایج بهینه مورد استفاده قرار می گیرند. از این‌رو نتایج متفاوتی در این خصوص حتی برای یک گونه تاکنون ارایه شده است [۶۹].

زمان آغاز شوک دهی (زمان پس از لقاح)، دوره شوک دهی و دمای شوک از مهم ترین عوامل موثر در موفقیت شوک جهت القاءی پلوییدی محسوب می گردند [۲۸]. همچنین عوامل دیگری نظیر ویژگی های خاص هر گونه (سرعت تکامل جنینی و تقسیمات سلولی) و دمای آب انکوباسیون قبل از اعمال شوک [۵۷]، اختلاف دمای آب نگهداری مولدین و دمای شوک [۵۸]، کیفیت گامت های مورد استفاده خصوصاً اندازه و درجه رسیدگی تخمک ها [۲۵] و حساسیت های خاص هر نژاد یا جمعیت نسبت به شوک در بازده شوک موثر خواهند بود. از این رو موفقیت القاءی تتراپلوییدی در یک گونه تابع شرایط خاصی است که در این تحقیق سعی در بهینه سازی آن در قزل آلای رنگین کمان می‌شود.

تفاوت اندازه (قطر) تخمک در بین گونه‌های مختلف، نرخ تکامل جنینی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تخم-هایی با اندازه بزرگ زمان انکوباسیون بلندتری را نسبت به تخم‌های کوچک دارند. اما اندازه تخمک در درون

گونه‌ها بر روی نرخ تکامل تاثیری ندارد، بلکه بر روی اندازه و بقاء لاروها اثر می‌گذارد به عبارت دیگر تخم‌های بزرگتر دارای بقاء بیشتر و اندازه بزرگتری نسبت به تخم‌های کوچکتر هستند. این موضوع در مورد آزاد ماهیانی همچون قزل‌آلای رنگین کمان، چینوک (*Oncorhynchus tshawytscha*) و ماهی آزاد اقیانوس اطلس به اثبات رسیده است. به علاوه، لاروهای حاصل از تخمک‌های بزرگتردوران لاروی طولانی‌تری دارند. فاکتورهایی در اندازه تخمک در درون گونه‌ها مؤثر هستند که می‌توان به اندازه مولدین (ماده‌های بزرگ‌تر تخم‌های بزرگ‌تری تولید می‌کنند به طور مثال در ماهی آزاد اقیانوس اطلس)، فصل (تخم‌هایی که در فصل مناسب استحصال می‌شوند اندازه بزرگتری نسبت به تخم‌هایی که در خارج از فصل استحصال می شوند، دارند) و تفاوت ژنتیکی(به طور مثال اندازه تخم متفاوت در بین نژادهای مختلف یک گونه از آزاد ماهیان) اشاره کرد [۳۸].

به طور معمول مزایای بچه ماهیان حاصله از تخم‌های بزرگتر بقاء و رشد بالاتراست. آزاد ماهیان برای مطالعه فاکتورهای مؤثر در اندازه تخمک به دلایلی نظیر اندازه تخمک متفاوت در بین گونه‌ها، جمعیت‌های مختلف و در خود جمعیت‌ها، اثر مثبت افزایش اندازه تخمک بر روی شاخص‌های پس از تفریخ (بقاء و رشد) [۴۲]، تحمل سطوح مختلف اکسیژن، فرضیه تخم‌های بزرگتر دارای دوران انکوباسیون بلندتری هستند در این گروه قابل تعریف و اثبات است. از طرفی دیگر تخم‌های کوچکتر معمولاً با سرعت بیشتری تحت تاثیر شوک ها قرار می-گیرند [۳۳].

اگرچه در زمینه تعیین شوک بهینه القاءی تتراپلوییدی در گونه های مختلف آزادماهیان در خارج از کشور[۱۹،۲۴،۶۸] و داخل کشور [۴]، مطالعاتی صورت گرفته اما با توجه به تفاوت های نژادی و فیزیولوژیک بین گروه های مختلف قزل آلای رنگین کمان، لازم است تا روش بهینه جهت تولید گله تتراپلویید تعیین گردد. همچنین لازم است تا اثر اندازه تخمک بر بازده شوک مورد ارزیابی قرار گیرد.

لذا سه هدف عمده این تحقیق عبارتند از:

الف- تعیین شوک بهینه حرارتی جهت القاء تتراپلوییدی در قزل‌آلای رنگین کمان

ب- اثر اندازه متفاوت تخمک بر روی القاء و بازده تتراپلوییدی

ج- مقایسه برخی شاخص های زیستی گله تتراپلویید با دیپلویید تا آغاز تغذیه خارجی

فصل دوم
کلیات و مرور منابع

۲-۱ کلیات

۲-۱-۱ تتراپلوییدی

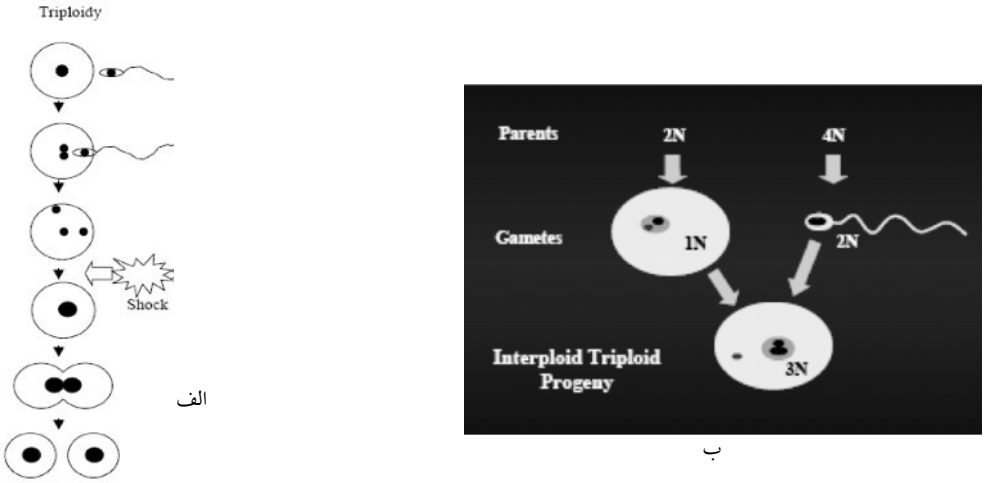
تتراپلوییدی یک راه ممکن برای دستکاری ژنوم در ماهیان است. یکی از کاربردهای مهم آن در ماهی‌ها تولید جمعیت های تریپلویید تماماً عقیم است که توسط لقاح بین تتراپلوییدها و دیپلوییدها تولید می شود. تریپلوییدی به عنوان یک روش برای کاهش اثرات ناشی از بلوغ در آبزی پروری کاربرد دارد.

جلوگیری و ممانعت از بلوغ جنسی باعث می شود که کیفیت لاشه در طول فصل تخم ریزی و تولیدمثل حفظ شود و همچنین مشکلات ناشی از بلوغ زودرس و مرگ و میر بعد از تخم ریزی را کاهش دهد [۵۲]. جلوگیری از بلوغ جنسی باعث تولید گوشت به مراتب بیشتر در ماهیان عقیم می‌شود و همچنین از تلاقی بین گونه های پرورشی فرار کرده از محیط پرورش و گونه های طبیعی ممانعت به عمل می‌آورد. تلاش برای تولید ماهیان عقیم به دو طریق هورمونی و ژنتیکی امکان پذیر است. نگرانی های جامعه در مصرف ماهیانی که مورد تیمار هورمون های استروییدی که موجب به تاخیر افتادن یا تغییر دادن تکامل جنسی در تولیدمثل ماهیان می شود، استفاده از آنها را محدود کرده است. به علاوه تیمارهای هورمونی ممکن است اثرات زیان آوری بر روی رشد و رفتارهای تولیدمثلی داشته باشد، از این‌رو روش های ژنتیکی مؤثرتر از روش‌های هورمونی هستند. ماهیان تریپلویید به دلیل داشتن یک دسته کروموزوم اضافی و به واسطه اخلال در تقسیم میوز به هنگام گامتوژنز معمولاً عقیم هستند. همچنین آنها از رشد بهتری در مقایسه با دیپلوییدها، معمولاً پس از بلوغ جنسی، برخوردار هستند [۳۵، ۷۱].

ایجاد تریپلوییدی در ماهیان به دو روش مستقیم (القایی) یا غیرمستقیم (غیرالقایی) امکان پذیر است. در روش القاءیی با استفاده از شوک های فیزیکی (شوک های دمایی و یا فشار) و یا شوک های شیمیایی در هنگام تقسیم دوم میوز در مرحله متافاز، از خروج گویچه قطبی دوم جلوگیری به عمل آمده و به این طریق جنین های تریپلویید تولید می شود. در روش غیرالقاءیی ابتدا، مولدین تتراپلویید از طریق اختلال در اولین تقسیم جنینی پس از لقاح با استفاده از شوک های فیزیکی یا شیمیایی تولید می گردد و سپس با آمیزش ماهیان تتراپلویید نر و دیپلویید ماده و یا آمیزش معکوس آن، ماهیان تریپلویید حاصل می گردد (شکل۲-۱). از مزایای روش غیر القاءیی موفقیت کامل در تولید ماهیان تریپلویید [۵۲] ونیز بهبود نسبی بازماندگی است [۱۳]. به نظر می رسد که روش غیرالقاءیی عملی‌تر و سودمندتر از القاء تریپلوییدی به وسیله شوک ها در مراحل اولیه تخم باشد. از این‌رو ماهیان مورد استفاده برای تولید مورد تیمار مستقیم، واقع نشده و والدین دیپلویید و تتراپلویید می توانند برای بهبود تولید، انتخاب شوند و تولید ماهیان تریپلویید با خصوصیات یکسان یا حتی برتر را سبب شوند. شرط لازم برای چنین استراتژی تکثیر توسعه و تکامل نسل تتراپلوییدها است.

تتراپلوییدی برای اولین بار به صورت آزمایشی در گیاهان، دوزیستان، و پستانداران با استفاده از مواد شیمیایی (کلشی سین یا سیتو کالاسین B) القاء شد [۶۴].

القاء مصنوعی تتراپلوییدی در گونه های مختلف ماهیان به وسیله شوک دیرهنگام صورت می گیرد. این شوک ها پس از جدایی دومین گویچه قطبی و قبل از اولین تقسیم و یا در حین اولین تقسیم میتوزی سلول به کار برده می شوند (شکل ۲- ۲).



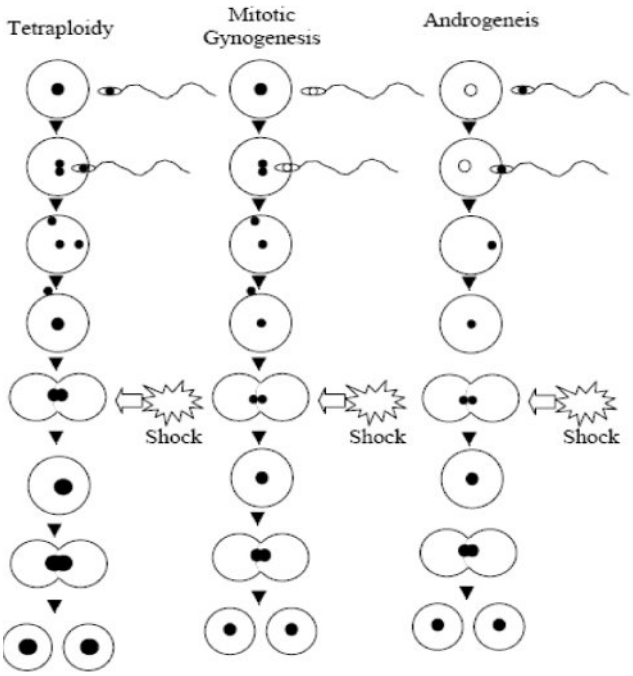
الف

ب

شکل ۲- ۱ نمای شماتیک روش‌های مستقیم (الف) و غیرمستقیم (ب) القاءی تریپلوییدی در ماهی قزل آلای رنگین کمان، در روش غیر مستقیم از مولدین نر تتراپلویید و مولدین ماده دیپلویید جهت تولید ماهیان تریپلویید عقیم استفاده می شود. در روش مستقیم با استفاده از شوک زود هنگام تریپلوییدی القاء می‌شود [۲۰].

تتراپلوییدی می تواند به وسیله کاربرد شوک ها در فازهای مختلف چرخه سلول در اولین تقسیم میتوز القاء شود. کاربرد شوک کمی پیش از اولین تقسیم میتوزی، که دلیل آن شکسته شدن رشته های اکتین و جلوگیری از

تشکیل خط تسهیم است، سیتوکینز[۱] نام دارد. کاربرد شوک در طول متافاز یا پیش از متافاز باعث جلوگیری از جدا شدن کروموزوم های خواهری می شود که به آن کاریوکینز[۲] می گویند. تتراپلوییدهای خودبخودی در ماهی لوچ گزارش شده است [۷]. تتراپلوییدی می تواند از هیبریدگیری (به طور مثال در کپور) نیز به وجود بیاید. از آنجا که القاءی تتراپلوییدی توسط شوک گرمایی سهل الوصول تر از دیگر شوک های فیزیکی است، لذا معمولترین روش جهت دستکاری کروموزومی در ماهیان محسوب می‌شود [۵].



شکل ۲- ۲ نمای شماتیک القاء تتراپلوییدی، ماده زاد میتوزی و نرزاد به وسیله جلوگیری از اولین تقسیم میتوزی. در تتراپلوییدی ممانعت بعد از مضاعف شدن DNA رخ می دهد [۲۴].

القای تتراپلوییدی از گونه های دیپلویید در خلال تسهیم اول جنینی از نظر تئوری امکان پذیر است. القاءی تتراپلوییدی در ماهیان به وسیله توقف تسهیم در اولین تقسیم به وسیله استفاده از روش های شیمیایی یا فیزیکی (شوک گرمایی یا سرمایی ، شوک فشاری) صورت می‌گیرد. القاء تتراپلوییدی بر اساس سرعت تکامل جنینی تنظیم می شود و از این رو برای انواع مختلف گونه های ماهیان متفاوت است. تفاوت‌های فردی در بین افراد ماده به طور واضح مشخص می کنند که این تفاوتهای فردی، در تولید جنین‌های تتراپلوییدی نقش مؤثری دارند. فاکتورهایی همچون زمان پس از لقاح، دماهای مختلف یا میزان بلوغ تخمک‌ها می‌توانند در موفقیت عمل

۱- Cytokinesis

۲ -Karyokinesis

پلوییدی مؤثر باشند. تخم‌هایی که کیفیت پایینی دارند به شوک حرارتی نیز واکنشی ضعیف نشان می دهند و میزان بازماندگی در آن‌ها خیلی پایین است [۲۵].

سطوح مختلف پلوییدی بر بقاء لاروها تاثیر گذار است به طوری‌که بقاء لاروها به دلیل استفاده از شوک های مختلف پایین آمده و باعث افزایش مرگ و میر در طی مراحل اولیه لاروی می‌شود. همچنین در برخی گونه‌ها رشد تتراپلوییدها نیز به طور مشخص پایین تر از دیپلوییدها گزارش شده است [۸].

طول مدت تکامل جنینی و تغییر پذیری این ویژگی برای چند گروه قزل‌آلای رنگین کمان (گروه‌های شاهد دیپلوییید، ماده زاد دیپلوییید، تریپلوییدهای حاصل از شوک حرارتی یا حاصل از تلاقی مستقیم بین دیپلوییید ماده و تتراپلوییید نر و تتراپلوییدها) مورد آزمایش واقع شد. گروه‌های پلوییدی مدت زمان تکامل جنینی کوتاهتر از مابقی گروه ها دارا هستند. گروه های تتراپلوییید قبل از گروه های تریپلوییید و دیپلوییید تفریخ می شوند.

مطالعات برروی ماهی قزل آلای رنگین کمان مشخص نموده اند که تریپلوییدهای حاصل از تلاقی تتراپلوییید و دیپلوییید مزایای برتری نسبت به تریپلوییدهای میوزی و گروه شاهد دارند [۲۱،۵۲]. به‌علاوه نرهای تتراپلوییید قزل آلای رنگین کمان گامتهایی تماماً دیپلوییید تولید می کنند در حالیکه ماده های تتراپلوییید اصولاً اووسیت های دیپلوییید با تعدادی اووسیت های تریپلوییید و تتراپلوییید تولید می نمایند [۲۲].

پس از انجام هر گونه دستکاری کروموزومی لازم است که صحت آن مورد ارزیابی قرار گیرد. تاکنون روش‌های متنوعی برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته است که به برخی از رایج‌ترین آن‌ها در خصوص اشاره شده است. به دلیل اینکه بافت‌های فرد پلی‌پلوییید دارای محتوای دی.اِن.اِ. بیشتر، اندازه هسته بزرگتر، تعداد کروموزوم بیشتر و اندازه سلولی بزرگتری نسبت به موجود دیپلوییید است پلوییدی می‌تواند به وسیله چندین روش شناسایی شود. جهت شناسایی ماهیان دستکاری شده می‌توان از روش های مختلفی استفاده کرد که به طور کلی شامل روش های مستقیم (نظیر کاریوتایپ) و روش های غیر مستقیم (نظیرگسترش خونی، آنالیز NORs[1]، استفاده از مارکرهای ژنتیکی و فلوسایتومتری) است.

روش های غیر مستقیم معمولاً برای شناسایی و بررسی صحت پلوییدی استفاده می گردد. در این میان روش های گسترش خونی و آنالیز NORs به دلیل سادگی و سرعت مناسب، بیشترین کاربرد را دارند. در روش گسترش خونی اندازه گیری سطح و حجم هسته های سلول های قرمز خون انجام می پذیرد. اندازه‌گیری ابعاد سلولی و هسته یکی از روش‌های معتبر جهت انواع پلوییدی است. ابعاد هسته یا سلول عمدتاً متاثر از محتوا یا میزان دی.اِن.اِ. آن خواهد بود. بدین لحاظ ماهیان تتراپلوییید به دلیل دارا بودن ۲n کروموزوم بیشتر در مقایسه با انواع دیپلوییید عموماً حدود ۲ برابر ابعاد بزرگتری دارند. به دلیل اینکه افزایش طول محور بزرگ هسته در جریان القاء پلوییدی کمی بیشتر از محور کوچک آن می باشد، میتوان از آن به عنوان شاخص استفاده کرد.

یک روش ساده تعیین سطح پلوییدی در ماهیان استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره سلول است. این روش شامل تعیین حداکثر تعداد هستک‌ها در هر سلول است که با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشخص می‌شود. هر بافتی در هر نوع سلولی می‌تواند مورد استفاده واقع شود و احتیاج به آنالیز کروموزوم نیست. مقدار بافت مورد نیاز برای ساختن لام‌ها خیلی اندک است. نتایج از سه گونه آزاد ماهیان (قزل‌آلای‌رنگین‌کمان، چینوک و کوهو)

۱- Nucleolar organize region: مناطق سازمان دهنده در هسته سلول

نشان داد که هاپلوییدها دارای حداکثر یک هستک، دیپلوییدها دارای حداکثریک یا دوهستک، تریپلوییدها دارای حداکثر دو یا سه هستک در سطح سلول هستند.

نواحی فعال هسته (NORs) می تواند به وسیله تکنیک رنگ آمیزی نقره تعیین شود [۴۱]. نقره به پروتئین های NOR متصل شده و می تواند همه هستک ها و مناطق فعال را نمایان سازد. مکان هستک ها و NOR در کروموزوم ها به روشنی توسط نقطه های قهوه ای- سیاه در هسته های زرد رنگ قابل مشاهده هستند. در ارگانیزم های دیپلویید که NOR آنها تنها در یک لوکوس (یک جفت کروموزوم) وجود دارد، یک یا حداکثر دو هستک می تواند تشکیل شود. در تریپلوییدها، یک، دو یا حداکثر سه هستک در سلول دیده می شود در حالی که در تتراپلوییدها حداکثر ۴ هستک قابل مشاهده است [۴۳].